

Jurnal Veteriner

ISSN : 1411-8327

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

Vol. 15 No. 4, Desember 2014

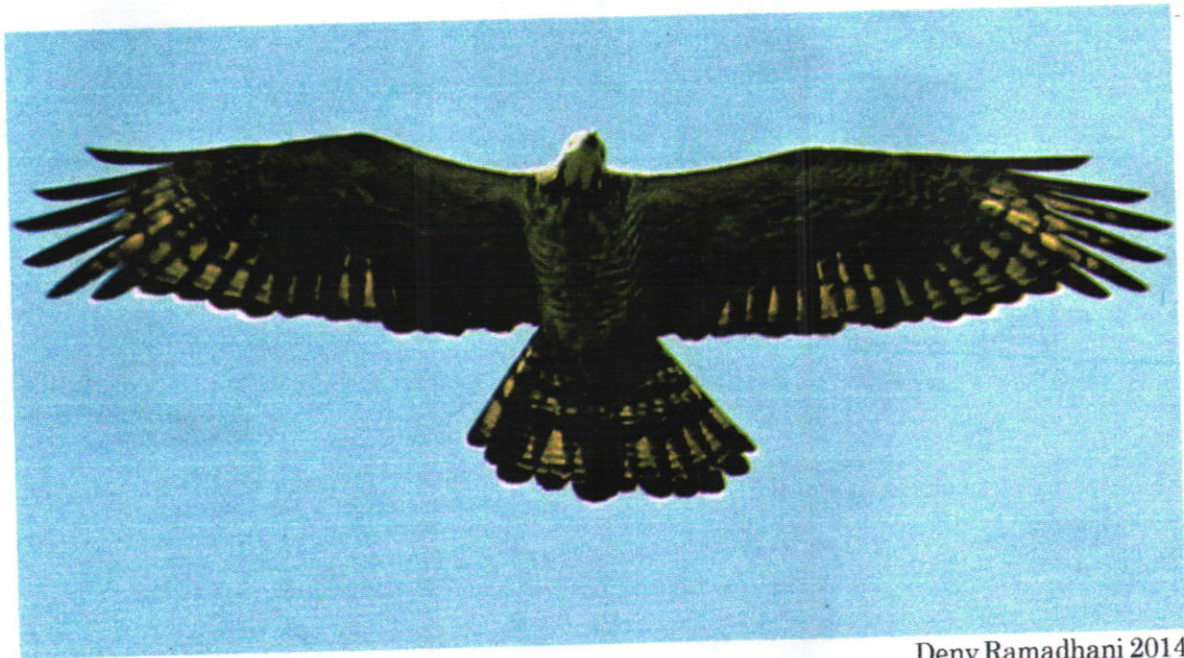
- Sipatah-patah meningkatkan proliferasi dan •
diferensiasi sel punca
- Analisis estradiol dan progesterone kambing kacang •
- Kriopreservasi spermatozoa dalam pengencer •
berimbuhan orvus ES paste
- Osteopontin meningkatkan •
ekspresi B-cell CLL spermatozoa
- Staphylococcus aureus* Pigmen Kuning asal •
Bumblefoot ayam *Broiler*
- Penyakit *Aeromonas* pada ikan air tawar di Bali •
- Sel darah putih dan indeks stres luwak jawa •
- Darah kambing gembong •
- Sel darah putih ayam terinfeksi flu burung •
yang diberi *Spirulina*
- Komposisi dan Fraksinasi Protein Susu Kuda Sumba •
- Kerugian ekonomi karena rabies di Bali •
- Sebaran karbohidrat pada kelenjar ludah biawak air •
- Pegangan menekan kerusakan •
jaringan tuberkulosis paru
- Daun salam menekan gula darah dan sel Kupffer •
- Tempe meningkatkan kualitas tulang Imbuhan putak •
- Imbuhan putak dalam pakan babi lokal dan babi VDL •
- Air liur sebagai perantara pemeriksaan noninvasif •
- Dermatitis karena *Malassezia* sp. pada hewan piara •

Vol 15, No 4 Desember 2014
Terakreditasi Dirjen Dikti
S.K. No. 81/DIKTI/Kep/2011

Jurnal Veteriner

Jurnal Kedokteran Hewan Indonesia
(Terbit : Maret, Juni, September, Desember)

ISSN : 1411
Website : ejournal.unud.ac.id
Jurnal Tiga Bulanan



Deny Ramadhani 2014

Sikep madu asia atau *oriental honey-buzzard* (*Pernis ptilorhynchus*) sedang melintas di dirgantara Gunung Lempuyang dan Gunung Agung Bali (Sabtu 1 Nop 2014). Setiap tahun pada bulan September-Nopember arus datang mereka melintasi Bali ke arah NTT untuk mencari madu makanan kesukaannya. Mereka tercatat sampai ke Australia.

Lelah terbang dari kampungnya di Siberia-Rusia sana, atau karena kemalaman, terkadang burung pengelana ini mampir sejenak untuk sekadar bermalam di kanopi hutan Gunung Lempuyang, Gunung Batukaru, atau Gunung Agung. Mereka biasanya kembali mudik ke Siberia pada bulan Februari-April, ketika musim salju telah usai. Jumlah yang kembali ke Siberia konon lebih sedikit. Diduga sebagian burung elang muda tersebut tinggal di Indonesia mencari makan hingga dewasa-kelamin dan mereka baru balik ke Siberia bersama arus mudik pada tahun-tahun berikutnya untuk berbiak dan melanjutkan kehidupan di kampungnya.

PEMIMPIN UMUM : I WAYAN BATAN **DEWAN REDAKSI :** NYOMAN MANTIK ASTAWA (KETUA), IDA BAGUS ARKA, NYOMAN SADRA DHARMAWAN, IWAN H. UTAMA, I GUSTI NGURAH KADE MAHARDIKA, I KETUT PUJA, I KETUT SUATHA, TJOK GDE OKA PEMAYUN, ROOSTITA L. BALIA, I KETUT BERATA, **REDAKTUR PELAKSANA :** I NYOMAN SUARTHA & I G M KRISNA ERAWAN, **SEKRETARIS REDAKSI :** I NYOMAN SUARSANA, **STAF REDAKSI :** I WAYAN SUARDANA, I GUSTINGURAH SUDISMA, AIDA LOUISE TENDEN ROMPIS, NI GUSTI AGUNG AYU SUARTINI, I MADE SUKADA, ANAK AGUNG SAGUNG KENDRAN, ANAK AGUNG AYU MIRAH ADI, I MADE KARDENA, YANA QOMARIANA. **TATA USAHA :** PUDJI RAHARDJO, WERDI SUSARI. **KANTOR REDAKSI & ALAMAT SURAT :** KLINIK HEWAN FKH UNUD, Jl. Raya Sesetan Gg. Markisa 6 Banjar Gaduh, Denpasar - Bali. **PENERBIT :** FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN, UNIVERSITAS UDAYANA BEKERJA SAMA DENGAN PERHIMPUNAN DOKTER HEWAN INDONESIA. **REKENING :** NOMOR 01186287054/N drh. I NYOMAN SUARTHA, M.Si BNI CABANG DENPASAR **DICETAK OLEH :** PERCETAKAN PELAWA SARI, JL. ANTOSURA 33 DENPASAR

Setiap naskah yang dikirim ke redaksi untuk dipublikasikan dalam Jurnal Veteriner akan dipandang sebagai karya asli penulis dan bila diterima, naskah tersebut tidak diperkenankan dipublikasikan lagi secara keseluruhan ataupun sebagian tanpa seijin Jurnal Veteriner.

Penurunan Kerusakan Jaringan Paru Terinfeksi Tuberkulosis oleh Ekstrak Pegagan Melalui Peningkatan Ekspresi *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1*

(SUPPLEMENTATION OF EFFECT ANALYSIS OF CENTELLA ASIATICA EXTRACT IN REDUCE LUNG TUBERCULOSIS TISSUE DAMAGE THROUGH INCREASE EXPRESSION TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE-1)

Arifa Mustika¹, Anny Setijo Rahaju², Roostantia Indrawati¹

^{1,3} Departemen Farmakologi, ²Departemen Patologi Anatomi,
Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga,
Jln Prof.Dr. Moestopo No 47 Surabaya 80131
Email : mustikaarifa@gmail.com

ABSTRAK

Pegagan atau *Centella asiatica* adalah tanaman obat yang digunakan untuk menyembuhkan luka melalui peningkatan sintesis kolagen. Fenomena ini menumbuhkan harapan bahwa tanaman tersebut bisa digunakan untuk penyembuhan kerusakan jaringan paru karena tuberkulosis. Sampai saat ini, pengaruh maupun mekanisme *C. asiatica* pada kerusakan jaringan paru karena infeksi *Mycobacterium tuberculosis* masih belum jelas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dan mekanisme ekstrak etanol *C. asiatica* dalam memperbaiki kerusakan jaringan paru tikus melalui ekspresi enzim *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) dan enzim *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (TIMP-1). Penelitian dilakukan pada tikus. Sebanyak 24 tikus diinfeksi dengan *M. tuberculosis* secara intratrakea kemudian dibagi secara acak menjadi empat kelompok. Kelompok 1, 2, dan 3 adalah kelompok perlakuan yang diterapi dengan ekstrak etanol *C. asiatica* pada dosis 375 mg/kgbb, 750 mg/kgbb, dan 1500 mg/kgbb perorale sehari sekali selama 14 hari. Kelompok 4 adalah kontrol yang diberi aquadest. Pada hari ke-15, tikus dikorbankan nyawanya untuk diambil jaringan paru. Evaluasi kerusakan jaringan paru dilakukan dengan pengecatan Hematoksin Eosin, ekspresi MMP-1 dan TIMP 1 dilakukan dengan teknik imunohistokimia. Analisis data dengan analisis varian $\alpha=0,05$ untuk TIMP-1, *Whitney Mann U* untuk kerusakan jaringan dan MMP-1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 375 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,006$), dosis 750 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,004$), dosis 1500 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,043$) pada kerusakan jaringan paru. Ekspresi MMP-1 menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Pada ekspresi TIMP-1, terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok yang memperoleh ekstrak etanol *C. asiatica* dosis 750 mg/kgbb dengan kontrol. Simpulan dari penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* mempunyai kemampuan untuk menurunkan kerusakan jaringan paru tikus karena tuberkulosis, melalui peningkatan ekspresi TIMP-1

Kata-kata kunci : *C. asiatica*, *M. tuberculosis*, paru, MMP-1, TIMP-1

ABSTRACT

Centella asiatica is a medicinal plant used for wound healing through increasing of collagen synthesis. This evidence generates a new expectation that it could be used for therapy of tuberculosis infection, especially for healing lung tissue damage. Until now, the effects and mechanisms on *C. asiatica* to cure the lung tissue damage due to *M. tuberculosis* infection remains unclear. The aim of this study was to prove the effect and mechanism of ethanol extract of *C. asiatica* to repair the rats lung tissue damaged through expression of the enzyme *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) and enzyme *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (TIMP-1). The study was conducted in male rats. Twenty four rats were infected with *M. tuberculosis* through intratrachea and randomly divided into four groups. Group 1, 2 and 3 were the treatment groups that they were given the ethanol extract of *C. asiatica* at dose 375mg/kgbw, 750 mg / kgbw, and 1500 mg / kgbw, orally and once a day for fourteen days. The fourth group was a control group that given distilled water. On day 15 rats were euthanized and lungs tissue have been taken. Evaluation of lungs tissue damage were assessed by the Dorman's score in Hematoxylin Eosin and evaluation of the

expression of MMP - 1 and TIMP 1 were performed by immunohistochemistry. Data of TIMP-1 were analyzed with ANOVA and data of lung tissue damage and MMP-1 were analyzed with Mann Whitney U ($\alpha = 0.05$). The results showed that there was a significant differences in the lungs tissue damage between the dose groups of 375 mg / kgbw and controls ($p = 0.006$), the dose groups at dose 750 mg / kgbw and controls ($p = 0.004$), the dose groups of 1500 mg / kgbw and controls ($p = 0.043$). There wasn't a significant difference between the treatment groups and control in the expression of MMP-1. In the expression of TIMP - 1, there was a significant difference between the treatment group at dose of 750 mg / kg and control. The conclusion of the study is the ethanol extract of *C. asiatica* has the ability to reduce lung tissue damage of rats infected with *M. tuberculosis*, through increase the expression of TIMP-1

Keywords : *C. asiatica*, *M. tuberculosis*, lung, MMP-1, TIMP-1

PENDAHULUAN

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *M. tuberculosis*. Penyakit ini termasuk *reemerging diseases*, yaitu penyakit yang sejak pertama ditemukan sampai saat ini masih belum dapat dieradikasi. Pada tahun 2009, jumlah penderita tuberkulosis di dunia 9,4 juta atau 137 kasus per 100.000 penduduk, sebanyak 35% adalah wanita. Jumlah penderita baru dan kambuh 292.753 per tahun. Penderita yang paling banyak terdapat di Asia 55%, Afrika 30%, Timur Tengah 7%, Eropa 4% dan Amerika 3%. Angka kematian 1,7 juta per tahun. Jadi hampir di seluruh dunia tidak terbebas dengan infeksi tuberkulosis. Indonesia menduduki peringkat kelima setelah India, Cina, Afrika Selatan, dan Nigeria (WHO, 2010).

Cara penyebaran dan penularan *M. tuberculosis* adalah melalui *droplet infection* sehingga organ paru merupakan target utama tempat terjadinya infeksi. Bakteri tersebut menyebabkan kerusakan jaringan paru. Kerusakan jaringan paru pada infeksi *M. tuberculosis* mulai berupa lesi morfologi yang terdiri dari infiltrasi sel radang sampai granuloma (Saunders *et al.*, 2007). Granuloma merupakan tanda stadium kronik infeksi *M. tuberculosis* sebagai usaha dari sistem imun pejamu untuk melokalisasi multiplikasi dan penyebaran lebih lanjut ke organ lain (Ordway *et al.*, 2005). Proses selanjutnya adalah terjadi nekrosis pada jaringan paru yang menyebabkan kerusakan jaringan.

Mekanisme kerusakan jaringan paru pada infeksi tuberkulosis disebabkan karena *M. tuberculosis* menginduksi ekspresi enzim *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1). Enzim MMP-1 merupakan anggota keluarga *matrix metalloproteinase* (MMPs) yang mempunyai fungsi untuk memecah matriks dan mengubah bentuk jaringan (Salgame, 2011). Enzim MMPs merupakan anggota dari keluarga protease yang

tergantung *zinc* yang secara kolektif mampu mendegradasi semua komponen matriks ekstraseluler. Aktivitas MMPs secara ketat diatur pada tingkat transkripsi dan aktivasinya dilakukan oleh pemecahan proteolitik. Enzim MMPs secara spesifik dihambat oleh enzim *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPs). Peningkatan yang berlebihan dari aktivitas enzim MMPs menyebabkan gambaran patologi yang luas pada jaringan paru yang ditandai dengan kerusakan matriks ekstraseluler (Rand *et al.*, 2009; Elkington *et al.*, 2011)

Pegagan atau *C. asiatica* adalah tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia dan digunakan sebagai bahan obat terutama untuk penyembuhan luka (Somashekar *et al.*, 2006) Ekstrak etanol *C. asiatica* mengandung bahan aktif *asiaticoside*, *madecasoside*, *asiatic acid* dan *madecasic acid* telah dibuktikan mempunyai kemampuan untuk meningkatkan sintesis kolagen (Maquart *et al.*, 1999; Coldren *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006; Djatmiko *et al.*, 2009; Hashim *et al.*, 2011). Sampai saat ini, pengaruh maupun mekanisme *C. asiatica* dalam memperbaiki kerusakan jaringan paru tikus akibat infeksi tuberkulosis masih belum diketahui. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui mekanisme *C. asiatica* dalam memperbaiki kerusakan jaringan paru tikus melalui ekspresi enzim MMP-1 dan enzim TIMP-1.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pegagan, *M. tuberculosis* dan hewan coba tikus. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah ketamin HCl injeksi (Hameln Pharmaceutical), etanol 96%, etanol 80%, etanol 70% (Brataco), aquades (Brataco),

carboxy methyl cellulosa natrium (Brataco), *Rabbit Anti-TIMP-1(NT) Polyclonal Antibody* (no katalog bs-0415R), *Rabbit Anti-MMP-1 Polyclonal Antibody* (no katalog bs-0424R), *Immunohistochemistry Kit* (antibodi sekunder, streptavidin-HRP, DAB dari Daco LSAB no katalog K0673).

Ekstrak Etanol *C. asiatica*. Tumbuhan yang digunakan adalah *C. asiatica* (pegagan) yang diambil dari Balai Materia Medika, Batu, Malang dan telah dilakukan determinasi di Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan (Bailey, 1953; Bunyaphrapatsara *et al.*, 1999). Tumbuhan pegagan dikeringkan dan dibuat serbuk. Serbuk tumbuhan diekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan antara serbuk dan etanol sebesar 1 : 10. Serbuk pegagan sebesar 500 gram direndam dalam dua liter etanol 70% di dalam bejana tertutup selama 24 jam pada suhu kamar sambil sering diaduk. Rendaman disaring dengan menggunakan penyaring *buchner* dan vakum ekstraktor. Filtrat dikumpulkan dan residu direndam kembali dengan pelarut etanol 70% yang baru. Filtrat yang dikumpulkan disebut dengan ekstrak etanol pegagan.

Hewan Coba. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan yang diperoleh dari Unit Hewan Coba, Universitas Gadjah Mada. Tikus yang dipilih berumur 2-3 bulan dengan bobot badan antara 125–200 gram (Orme, 2003; Gupta *et al.*, 2005). **Bakteri *M. tuberculosis*** yang digunakan adalah strain H₃₇ RV (ATCC27294) yang diperoleh dari Laboratorium Tuberkulosis, Lembaga Penyakit Tropik, Universitas Airlangga

Model Infeksi *M. tuberculosis* pada Tikus. Dua puluh empat tikus dipelihara dalam kabinet *biosafety* di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Tikus diberi makanan dan minuman secara *ad libitum*. Tikus diinfeksi dengan *M. tuberculosis* melalui trakea. Tikus dibius terlebih dahulu sebelum diinfeksi dengan *M. tuberculosis*. Obat bius Ketamin HCl (Hameln Pharmaceutical) diberikan kepada tikus secara injeksi intramuskuler. Dosis ketamin adalah 50 mg/kgbb (Kusumawati, 2004). Setelah tikus terbius, tikus difiksasi terlentang dan dibuat insisi pada leher sepanjang 0,5-1,0 cm, setelah terlihat trakea, suspensi bakteri diinjeksikan ke dalam trakea. Dosis *M. tuberculosis* adalah 10⁸/mL, diinjeksikan ke trakea sebanyak 50µL. Luka insisi dijahit dan diberi betadin (Pando *et al.*,

1998; Adolfo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009).

Perlakuan Ekstrak *C. asiatica*. Pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* pada kelompok perlakuan dimulai pada hari ke-29 setelah infeksi dengan *M. tuberculosis*. Dosis ekstrak etanol *C. asiatica* yang diberikan pada tikus sesuai dengan bobot badan secara peroral satu kali sehari selama 14 hari. Dosis ekstrak etanol *C. asiatica* adalah 375 mg/kgbb untuk kelompok 1, 750 mg/kgbb untuk kelompok 2 dan 1500 mg/kgbb untuk kelompok 3. Ekstrak diberikan secara per oral dalam bentuk suspensi satu kali sehari selama 14 hari sesuai dengan bobot badan tikus (Gnanapragrasam *et al.*, 2004; Gitawati, 2005; Shomashekar, 2006; George *et al.*, 2009; Djatmiko *et al.*, 2009). Tikus pada kelompok 4 yaitu kelompok kontrol memperoleh suspensi *carboxymethyl cellulosa natrium* 1% dalam aquadestilata.

Pada hari ke-15 setelah perlakuan, tikus pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol dikorbankan nyawanya untuk diambil organ paru dan dimasukkan ke dalam formalin *buffer* 10% untuk diproses lebih lanjut dan dilakukan pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia.

Pemeriksaan MMP-1 dan TIMPs 1. Ekspresi MMP1 pada jaringan paru tikus diperiksa dengan menggunakan teknik pengecatan imunohistokimia. Evaluasi MMP1 dilakukan dengan menghitung jumlah persentase sel yang positif pada setiap lapang pandang. Lima lapang pandang dipilih secara acak dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Sel yang positif ditandai dengan sitoplasma yang berwarna coklat. Penilaian dilakukan berdasarkan intensitas pewarnaan dan persentase sel yang positif. Kriteria penilaian untuk derajat intensitas adalah tidak ada pewarnaan (0), lemah (1), sedang (2), dan kuat (3). Kriteria penilaian persentase sel yang positif adalah 0-10% (1), 11-20% (2), 21-30% (3), 31-40% (4), 41-50% (5), 51-60% (6), 61-70% (7), 71-80% (8), 81-90% (9), 91-100% (10). Skoring ini merupakan modifikasi dari metode Kuskunovic *et al.*, 2009.

Ekspresi TIMPs 1 pada jaringan paru tikus diperiksa dengan menggunakan teknik pewarnaan imunohistokimia. Evaluasi ekspresi TIMPs1 dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang positif pada setiap lapang pandang. Lima lapang pandang dipilih secara acak dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Sel yang positif ditandai dengan

sitoplasma yang berwarna coklat (Ganachari *et al.*,2010).

Kerusakan Jaringan Paru. Kerusakan jaringan paru tikus adalah kerusakan jaringan paru tikus yang dinilai dengan menggunakan skor dari Dormans. Penilaian kerusakan berdasarkan parameter histopatologi : peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis, dan pembentukan granuloma. Secara semikuantitatif tiap parameter dinilai dengan tidak ada (0), minimal, apabila hanya terdapat infiltrasi sel inflamasi dominan polimorfonuklear (1), ringan, apabila terdapat sel inflamasi dominan mononuklear dengan ketebalan di bawah 5µM (2), sedang, apabila terdapat sel inflamasi dominan mononuklear dengan ketebalan 5-10 µM (3), jelas apabila terdapat sel inflamasi dominan mononuklear dengan ketebalan di atas 10 µM (4), dan berat, apabila terdapat kerusakan endotel dan sel inflamasi (5) (Dormans, 2004).

Analisis data. Analisis data pada kerusakan jaringan dan ekspresi MMP 1 dengan menggunakan *Whitney Mann U* dan *Wilcoxon*. Data ekspresi TIMPs 1 dianalisis dengan menggunakan *Anova* ($\alpha = 0,05$). Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga No 129-KE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kerusakan Jaringan Paru Tikus. Hasil pemeriksaan efek ekstrak etanol *C. asiatica* terhadap kerusakan jaringan paru tikus yang diinfeksi *M. tuberculosis* berdasarkan empat parameter histologi dari Dormans antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Tabel 1. Kejadian peribronkiolitis jaringan paru tikus antar kelompok tikus yang memperoleh perlakuan ekstrak etanol pegagan

Dosis pegagan (mg/kgbb)	Median	Minimum	Maksimum
375	2 ^a	2	5
750	2 ^a	1	5
1500	3 ^a	2	5
0 / Kontrol	3 ^a	2	5

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Peribronkiolitis terjadi pada semua kelompok baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Gambaran kerusakan yang terjadi antara ringan (skor 1) yaitu terdapat infiltrasi sel makrofag di sekitar bronkus dengan ketebalan di bawah 5µM sedang (skor 2) sampai berat skor (5), yaitu terdapat infiltrasi sel makrofag dan kerusakan epitel bronkus. Hasil analisis statistika menunjukkan ada perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kontrol, tetapi tidak bermakna secara statistik (Tabel 1).

Perivaskulitis yang terjadi pada kelompok 1 (dosis ekstrak 375 mg/kgbb) dan kelompok 3 (dosis ekstrak 1500 mg/kgbb) adalah ringan (skor 2) yaitu terdapat infiltrasi sel makrofag di sekitar pembuluh darah, pada kelompok 3 (dosis ekstrak 750 mg/kgbb) perivaskulitis yang terjadi adalah minimal (skor 1) yaitu hanya terdapat infiltrasi sel radang polimorfonuklear. Pada kelompok kontrol perivaskulitis yang terjadi adalah jelas yaitu infiltrasi sel makrofag disekitar pembuluh darah ketebalannya lebih dari 10 µM dan terjadi kerusakan dinding pembuluh darah (skor 5)

Tabel 2. Kejadian perivaskulitis jaringan paru antar kelompok tikus yang memperoleh perlakuan ekstrak etanol pegagan

Dosis pegagan (mg/kgbb)	Median	Minimum	Maksimum
375	2 ^{a b}	1	2
750	1 ^a	1	2
1500	2 ^{b c}	2	3
0/Kontrol	3,5 ^c	3	5

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Hasil analisis statistika menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 375 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,027$) dan antara 750 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,012$), antara dosis 750 mg/kgbb dengan dosis 1500 mg/kgbb ($p=0,025$) (Tabel 2).

Alveolitis yang terjadi pada jaringan paru tikus kelompok 1 pada dosis ekstrak 375 mg/kgbb, 750 mg/kgbb dan 1500 mg/kgbb adalah ringan (skor2) yaitu terdapat infiltrasi sel mononuklear pada dinding alveoli. Pada kelompok kontrol alveolitis yang terjadi adalah jelas yaitu infiltrasi sel makrofag di sekitar

pembuluh darah ketebalannya lebih dari 10 μ M (skor 4).

Tabel 3 Kejadian alveolitis jaringan paru antar kelompok tikus yang memperoleh perlakuan ekstrak etanol pegagan

Dosis pegagan (mg/kgbb)	Median	Minimum	Maksimum
375	2 ^a	2	4
750	3 ^a	2	5
1500	3 ^{a b}	2	5
0/Kontrol	4 ^b	3	5

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

Hasil analisis statistika menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 375 mg/kgbb dengan kelompok kontrol ($p=0,01$), antara dosis 750 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,033$) (Tabel 3).

Efek ekstrak etanol *C. asiatica* terhadap pembentukan granuloma pada jaringan paru tikus menunjukkan adanya perbedaan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada pemberian ekstrak pegagan dengan dosis 375 mg/kgbb, 750 mg/kgbb, dan 1500 mg/kgbb menunjukkan skor 1, sedangkan pada kelompok kontrol menunjukkan skor 3, tetapi tidak bermakna secara statistik (Tabel 4)

Tabel 4 Kejadian pembentukan granuloma jaringan paru antar kelompok tikus yang memperoleh perlakuan ekstrak etanol pegagan

Dosis pegagan (mg/kgbb)	Median	Minimum	Maksimum
375	0 ^a	0	1
750	0 ^a	0	1
1500	0 ^a	0	1
0/Kontrol	2 ^a	0	3

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Jumlah total skor Dormans antara kelompok yang memperoleh ekstrak etanol pegagan dan kelompok kontrol menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 375 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,006$), dosis 750 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,004$), dosis 1500 mg/kgbb dengan kontrol ($p=0,043$) (Tabel 5). Hasil terbaik teramati pada kelompok yang memperoleh ekstrak etanol *C. asiatica* pada dosis 750 mg/kgbb

Tabel 5. Jumlah total skor Dormans kerusakan jaringan paru antar kelompok tikus yang memperoleh perlakuan ekstrak etanol pegagan

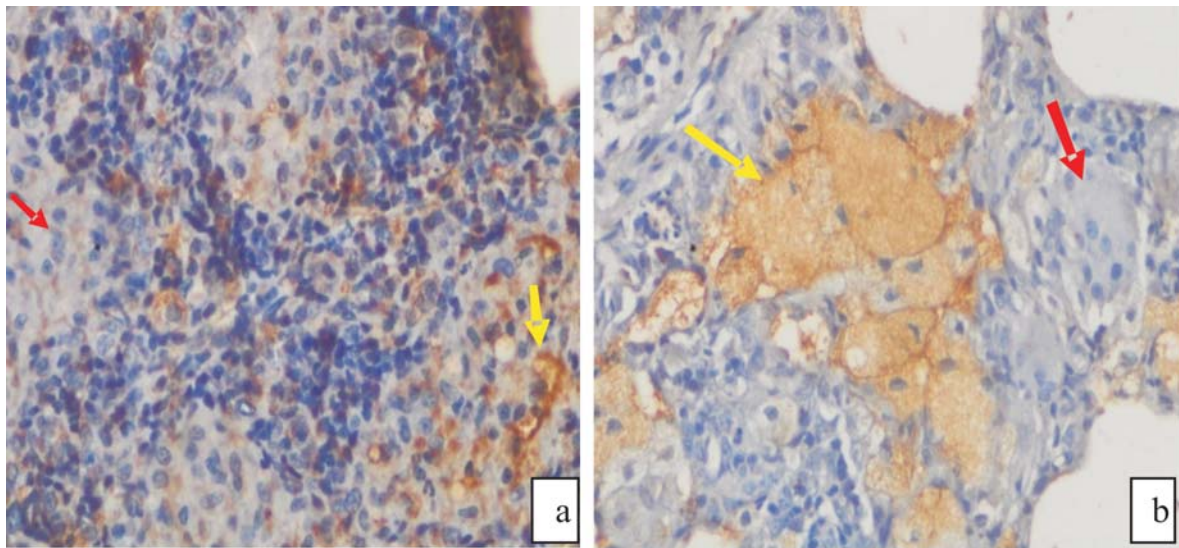
Dosis pegagan (mg/kgbb)	Median	Minimum	Maksimum
375	8 ^a	5	11
750	7 ^a	6	9
1500	8,5 ^a	7	12
0/Kontrol	12,5 ^b	9	17

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

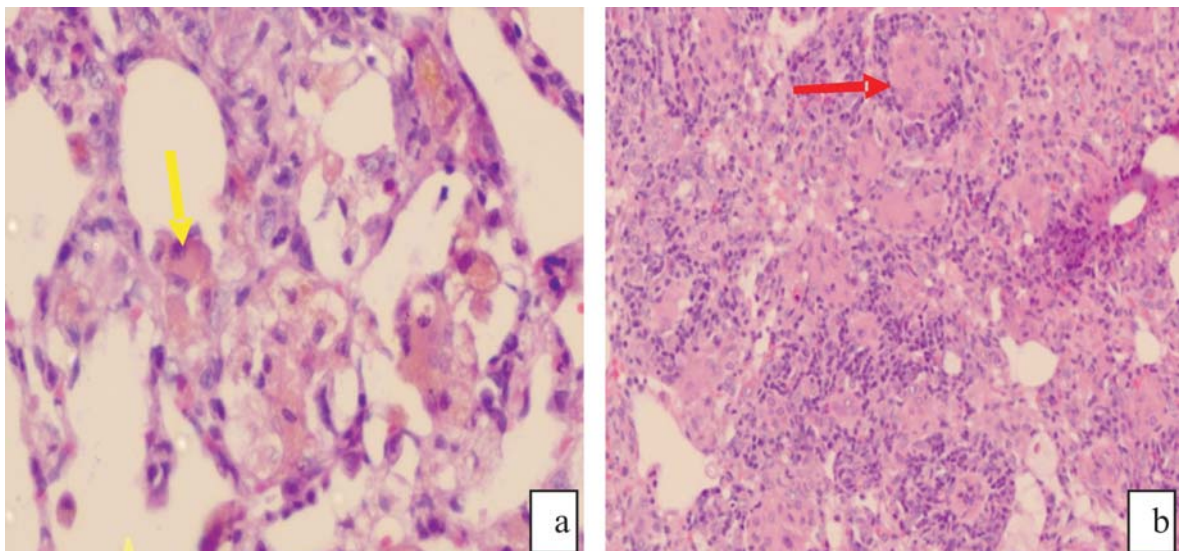
Ekspresi MMP-1 pada Jaringan Paru Tikus

Ekspresi MMP1 dari jaringan paru tikus antara kelompok yang memperoleh ekstrak etanol pegagan dengan kelompok kontrol diperiksa dengan menggunakan imunohistokimia. Ekspresi MMP 1 dinyatakan positif jika sitoplasma sel berwarna coklat, sedangkan ekspresi negatif bila sitoplasma sel tidak berwarna coklat (Gambar 1a).

Hasil pemeriksaan efek ekstrak etanol *C. asiatica* terhadap ekspresi MMP1 pada jaringan paru tikus yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan terdapat perbedaan pada kelompok yang memperoleh ekstrak etanol *C. asiatica* dosis 375 mg/kgbb, 750 mg/kgbb, dan 1500 mg/kgbb dengan kelompok yang tidak memperoleh ekstrak. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* menurunkan ekspresi MMP1 pada jaringan paru tikus yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* pada dosis 750 mg/kgbb dan 1500 mg/kgbb, tetapi tidak bermakna secara statistika (Tabel 6).



Gambar 1. Hasil pengecatan imunohistokimia (a) ekspresi MMP1, (b) ekspresi TIMP-1 pada jaringan paru tikus. Sitoplasma sel yang berwarna coklat menunjukkan ekspresi positif (panah kuning) sedangkan yang tidak bewarna menunjukkan hasil negatif (panah merah). Pembesaran 400x.



Gambar 2. Hasil Pengecatan Hematoksilin Eosin jaringan paru tikus yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*. (a) Infiltrasi sel makrofag alveolar (panah kuning). (b) Lesi granuloma dengan gambaran khas sel datia Laghans (panah merah). Pembesaran 200x

Tabel 6. Ekspresi MMP-1 sel pada jaringan paru antar kelompok tikus yang memperoleh ekstrak etanol pegagan

Dosis pegagan (mg/kgbb)	Median	Minimum	Maksimum
375	22,5 ^a	18	24
750	22,5 ^a	14	27
1500	22,5 ^a	18	24
0/Kontrol	24,5 ^a	12	27

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna
MMP-1= matrix metalloproteinase-1

Ekspresi TIMPs-1 pada jaringan paru tikus

Ekspresi TIMPs-1 dari jaringan paru tikus antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol diperiksa dengan menggunakan imunohistokimia. Ekspresi TIMPs-1 dikatakan positif jika sitoplasma sel berwarna coklat, sedangkan ekspresi negatif bila sitoplasma sel tidak berwarna coklat (Gambar 1b).

Hasil pemeriksaan efek ekstrak etanol *C. asiatica* terhadap ekspresi TIMP-1 pada jaringan paru tikus yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok yang memperoleh ekstrak etanol *C. asiatica* dosis 750 mg/kgbb dengan kontrol. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* meningkatkan ekspresi TIMPs-1 pada jaringan paru tikus yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* pada dosis 750 mg/kgbb (Tabel 7).

Tabel 7. Ekspresi TIMP 1 sel pada jaringan paru antar kelompok tikus yang memperoleh perlakuan ekstrak etanol pegagan $\alpha=0,05$.

Dosis pegagan (mg/kgbb)	x	SD	Minimum	Maksimum
375	53,72 ^{ap}	21,64	26,00	85,00
750	86,10 ^a	43,63	46,00	161,80
1500	40,43 ^{ap}	25,38	15,00	74,60
0/Kontrol	42,30 ^b	13,19	26,80	61,40

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna
TIMP-1 = tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1
x = rerata, SD = simpangan baku

Pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* menurunkan derajat kerusakan jaringan paru tikus secara bermakna untuk variabel perivaskulitis, alveolitis, dan lesi granuloma. Perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol pada parameter peribronkiolitis, kemungkinan disebabkan karena cara *M. tuberculosis* diinfeksi melalui intratrakea. Cara ini berarti bahwa bakteri akan melalui bronkus terlebih dahulu sebelum melakukan invasi ke jaringan paru. Keberadaan *M. tuberculosis* pada bronkus menyebabkan respons imun tubuh melakukan perlawanan dengan memobilisasi sel radang (reaksi inflamasi). Mobilisasi sel radang tersebut bertujuan untuk mencegah *M. tuberculosis* menginvasi ke dalam jaringan paru. Proses inflamasi ini menyebabkan peribronkiolitis. Walaupun demikian, bila dilihat dari gambaran kerusakan yang terjadi pada peribronkioli terdapat perbedaan derajat kerusakan. Pada kelompok tikus yang tidak memperoleh terapi ekstrak etanol *C. asiatica* derajat kerusakan sedang sampai berat. Derajat kerusakan peribronkioli paling ringan ada pada kelompok tikus yang memperoleh ekstrak etanol *C. asiatica* dosis 750 mg/kgbb.

Pada kelompok kontrol tikus tidak mendapat ekstrak etanol *C. asiatica*, kerusakan jaringan berdasarkan skor Dormans yaitu peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis, dan granuloma adalah sedang sampai berat. Granuloma merupakan respons utama dari stadium kronik infeksi *M. tuberculosis* yang memperlihatkan respons dari sistem imun untuk melokalisasi multiplikasi dan penyebaran lanjut dari bakteri tersebut ke sel dan organ lain (Cardona et al., 2000; Ordway et al., 2005). Infiltrasi sel radang didominasi oleh sel makrofag alveolar (Gambar 2a) dan mulai merusak jaringan parenkim paru. Pada kelompok ini semua hewan coba menunjukkan bentukan granuloma dengan gambaran khas sel datia Laghans (Gambar 2b). Gambaran ini menunjukkan adanya infeksi kronis tuberculosis pada tikus (Pando et al., 1998).

Peningkatan dosis ekstrak etanol *C. asiatica* yang diberikan dari dosis terkecil 375 mg/kgbb, 750 mg/kgbb, dan 1500mg/kgbb tidak secara linier menurunkan kerusakan jaringan paru. Data penelitian menunjukkan derajat kerusakan paru terendah pada pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* pada dosis 750 mg/kgbb. Efek terapeutik suatu obat tergantung pada interaksi antara bahan aktif suatu obat

dengan reseptor yang spesifik. Ikatan tersebut menyebabkan perubahan bentuk reseptor sehingga memicu respons sel. Respons sel ditentukan oleh afinitas dan efikasi antara bahan aktif dengan reseptornya. Afinitas adalah ukuran kemampuan obat untuk berikatan dengan reseptor, sedangkan afinitas adalah kemampuan obat terikat untuk mengubah reseptor sehingga memberikan efek (Zastrow, 2010; Ross et al., 1985). Suatu bahan aktif bisa mempunyai afinitas tetapi tidak menunjukkan efikasi. Bahan aktif yang dimiliki oleh ekstrak etanol *C. asiatica* pada dosis 375 mg/kgbb kemungkinan mempunyai afinitas yang rendah sehingga belum bisa memberikan efek farmakologi yang maksimum. Pada dosis 1500 mg/kgbb, bahan aktif dari ekstrak etanol *C. asiatica* mengalami desensitisasi reseptor, yaitu mempunyai efikasi yang rendah sehingga efek terapeutik yang diberikannya juga belum optimum. Kemungkinan lain adalah terjadi down regulation yaitu jumlah reseptor pada permukaan sel menurun (Zastrow, 2010). Berdasarkan hasil penelitian ini, diperkirakan bahwa dosis terapi optimum ekstrak *C. asiatica* pada dosis 750 mg/kgbb.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* menurunkan ekspresi MMP-1 pada sel di jaringan paru terutama pada dosis 750 mg/kgbb walaupun tidak bermakna secara statistika. Hasil ini sejalan dengan hasil skoring derajat kerusakan jaringan paru tikus bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* menurunkan kerusakan jaringan paru terutama pada dosis 750 mg/kgbb.

Matriks ekstraseluler paru didukung oleh kolagen fibriliar yang mempunyai resistensi tinggi terhadap pemecah enzim. Enzim MMP-1 merupakan salah satu enzim yang mampu mendegradasi kolagen pada pH netral. Kerusakan jaringan paru pada infeksi tuberkulosis salah satunya disebabkan karena *M. tuberculosis* menginduksi ekspresi enzim MMP-1 (Salgame, 2011). Enzim MMP-1 secara spesifik telah ditunjukkan mempunyai kemampuan melakukan degradasi terhadap kolagen tipe I yang menyebabkan kerusakan jaringan paru. Pada penelitian mencit yang diinfeksi oleh *M. tuberculosis*, menunjukkan adanya peningkatan enzim MMP-1 yang mempunyai korelasi yang kuat dengan peningkatan kerusakan jaringan alveoli dan secara signifikan terjadi peningkatan pemecahan kolagen (Elkington et al., 2011).

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan mekanisme ekstrak etanol *C. asiatica* dalam menurunkan kerusakan jaringan paru adalah melalui hambatan terhadap ekspresi MMP 1, sehingga tidak terjadi pemecahan kolagen. Selain itu, mekanisme ekstrak etanol *C. asiatica* dalam meningkatkan resolusi jaringan paru juga bisa disebabkan karena ekstrak etanol *C. asiatica* mengandung bahan aktif asiaticoside yang diduga mempunyai kemampuan untuk meningkatkan sintesis kolagen (Maquart et al., 1999; Coldren et al., 2003; Lee et al., 2006; Djatmiko et al., 2009; Hashim et al., 2011). Oleh karena itu, kemungkinan mekanisme kerja ekstrak etanol *C. asiatica* dalam memperbaiki kerusakan jaringan paru melalui dua hal yaitu, melalui hambatan ekspresi enzim MMP1 dan peningkatan sintesis kolagen.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* meningkatkan ekspresi TIMP-1 pada jaringan paru tikus. Enzim TIMP-1 merupakan enzim yang menghambat aktivitas enzim MMP-1. Enzim MMP-1 merupakan salah satu enzim yang menjadi target terapi tuberkulosis terutama untuk membatasi proses imunopatologi. Sampai saat ini angka kematian penderita tuberkulosis karena proses imunopatologi yang merupakan hasil dari reaksi inflamasi yang berlebihan sehingga menyebabkan kerusakan (Elkington et al., 2011). Oleh karena itu, penemuan terapi imunomodulator untuk menghambat aktivitas MMPs terutama MMP 1 sebagai terapi untuk menurunkan kerusakan jaringan paru merupakan usaha yang perlu dibangkitkan. Saat ini obat yang sudah direkomendasikan oleh Amerika Serikat sebagai penghambat enzim MMPs adalah doksisisiklin pada dosis di bawah dosis antibiotik dan digunakan sebagai inhibitor MMPs untuk menurunkan aktivitas enzim kolagenase pada penyakit periodental. Namun, hal ini perlu diwaspadai bahwa penggunaan antibiotik dengan dosis yang kurang tepat akan meningkatkan resistensi. Fenomena ini menyebabkan penelitian obat baru sebagai inhibitor MMPs mendapat perhatian dunia (Elkington et al., 2011)

Ekstrak etanol *C. asiatica* pada penelitian ini menumbuhkan harapan baru bahwa ekstrak tanaman tersebut dapat digunakan sebagai imunomodulator untuk menurunkan kerusakan jaringan paru melalui hambatan terhadap MMP

1 dan peningkatan ekspresi enzim TIMP 1 yang merupakan inhibitor dari MMP 1. Hasil penelitian ini sesuai dengan proses imunopatologi tuberkulosis, pada proses tersebut *M. tuberculosis* menginduksi sel terutama makrofag untuk memproduksi enzim pro MMP1 dan MMP 3, dan MMP3 akan menginduksi pro MMP1 menjadi MMP 1 yang mendegradasi kolagen tipe I. Selain itu, *M. tuberculosis* juga menginduksi makrofag untuk meningkatkan sekresi TNF α , Interleukin 10 dan Oncostatin M. Ketiga sitokin tersebut, menstimulasi sel stromal untuk mensekresi enzim pro MMP 1 dan menghambat sekresi TIMP 1 (Elkington et al., 2006; Elkington et al., 2011). Jadi kemungkinan mekanisme ekstrak etanol *C. asiatica* menurunkan kerusakan jaringan paru tikus yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* adalah melalui mekanisme tersebut.

Pada penelitian ini, proses patogenesis infeksi tuberkulosis pada tikus sudah berjalan selama empat minggu, sehingga *M. tuberculosis* sudah menginduksi sekresi enzim MMP 1 dan menghambat TIMP 1. Terapi ekstrak etanol *C. asiatica* pada tikus dimulai pada minggu ke-4 setelah infeksi dan diberikan selama dua minggu. Masa terapi yang dua minggu ini kemungkinan belum bisa memberikan penurunan ekspresi enzim MMP 1 secara bermakna, tetapi hasil penelitian menunjukkan bahwa sudah terjadi perbaikan kerusakan jaringan paru. Hasil ini sejalan dengan hasil penilaian kerusakan jaringan paru yang menunjukkan penurunan derajat kerusakan jaringan paru pada kelompok perlakuan terutama pada dosis 750 mg/kgbb.

SIMPULAN

Ekstrak etanol *C. asiatica* pada dosis 750 mg/kgbb menurunkan kerusakan pada jaringan paru tikus yang diinfeksi *M. tuberculosis* dengan meningkatkan ekspresi enzim TIMP-1.

SARAN

Perlu dilakukan uji efek ekstrak etanol *C. asiatica* pada kadar TNF α , Interleukin 10 dan Oncostatin M pada tikus yang diinfeksi *M. tuberculosis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dekan FKUA Prof Dr dr Agung Pranoto, MKes, SpPD, K-EMD, FINASIM; kepada Dr Djoko Agus Purwanto, Apt, MKes, sebagai Ketua LPPM Unair dan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, yang telah bersedia memberikan kesempatan saya untuk melaksanakan penelitian ini dengan pembiayaan dari BOPTN tahun 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Adolfo Ro-BVc, Victoria C-Pa, Diana A-Ln, Ricardo LL, Antonio M-RoM, Jos M, Victor F-G, Rogelio Hn-P, 2006. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. *Eur J Immunol* 36: 345-353.
- Bailey LH, 1953. The standard cyclopedia of horticultura. Jilid 1.3.
- Basaraba R J, 2008. Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improvement tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis* 88 (1): S35-47.
- Bunyaphrapatsara N, Padua LS, Lemmens RHMJ, 1999. Plant resources of south-east asia no 12(1). Bogor Indonesia: 190-194.
- Cardona PJ, Llatjós R, Gordillo S, Díaz J, Ojanguren I, Ariza A, 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *M. tuberculosis*. *Scand J Immunol* 52: 156-163..
- Coldren CD, Hashim P, Ali JM, Oh S, Sinskey AJ, Rha C, 2003. Gene expression Changes in the H μ Man Fibroblast Induced by *C. asiatica* Triterpenoids. *Planta Med* 69: 725-732.
- Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend S M, Van Soolingen D. 2004. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *M. tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 137: 460-468.

- Djarmiko W. 2009. Pengembangan dan Pemanfaatan tanaman Obat Indonesia menjadi produk fitofarmaka dengan teknologi fitosom untuk Terapi Tuberkulosis. Laporan akhir Program Hibah Kompetitif Penelitian Unggulan Strategis Nasional tahun anggaran 2009
- Elkington PT, Nuttall RK, Boyle JJ, O'kane CM, Horncastle DE, Edwards DR, Friedland JS. 2005. M. tuberculosis, but not vaccine BCG, specifically upregulates matrix metalloproteinase-1. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1596-604.
- Elkington, P. T. & Friedland, J. S. 2006. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax* 61: 259-66.
- Elkington P, Shiomi T, Breen R, Nuttall RK, Upgarte-Gill CA, Walke NF, Saraiva L, Pederson B, Mauri F, Lipman M, Edwards DR, Robertson BD, D'Armiento J, Friedland JS, 2011. MMP-1 drives immunopathology in human tuberculosis and transgenic mice. *J Clin Immunol* 121 (5): 1827-1833.
- Ganachari M, Ruis-Morales JA, Pretell G, Dinh J, Granados J, Flores-Villanueva P, 2010. Joint effect of MCP-1 genotype GG and MMP-1 genotype 2G/2G increases the likelihood of developing pulmonary tuberculosis in BCG-vaccinated individuals. *Plos one* 5 (1): e8881.
- Gaonkar S, Balasubramanian V, Sowmya B, Radha KS, Naveen K 2010. Aerosol infection model of tuberculosis in Wistar Rats. *Int J Microbiol*: 1-6.
- George M, Joseph L, Ramaswamy. 2009. Anti-Allergic, Anti-Pruritic, and anti-inflammatory activities of *Centella asiatica* extracts. *Afr J Traditional CAM* 6: 554 - 559.
- Gnanapragasam A, Ebenezer KK, Sathish V, Govindaraju P, Devaki T. 2004. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 76: 585-97.
- Gitawati R, Astuti Y, Winarno W, 2005. Herba pegagan (*C. asiatica* L): Studi pendahuluan efek anti mikobakterium secara invitro. *JBAI* 4(2): 286-291.
- Gupta UD, Katoch VM, 2005. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis* 85: 277-93.
- Hashim P, Sidek H, Helan MHM, Sabery A, Palanisamy UD, Ilham M, 2011. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Mol* 16: 1310-1322.
- Kuskunovic S, Radovic S, Doric M, Hukic A, Babic M, Tomic I, Selak I, 2009. Immunohistochemical expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in invasive breast carcinoma. *Bosnian J of basic med sci* 9 (2): 125-130.
- Kusumawati D, 2004. Teknik eksperimentasi. Bersahabat dengan hewan coba. Ed 1. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press: 102-110.
- Lee YS, Jin DQ, Kwon EJ, Park SH, Lee ES, Jeong TC, Doo Hyun Nam, Huh K, Kim JA. 2002. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Canc Lett* 186: 83-91.
- Maquart FX, Chastang F, Simeon A, Birembaut P, Gillery P, Wegrowski Y, 1999. Triterpenes from *C. asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat
- Ordway D, Henao-Tamayo M, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M, 2005. Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *M. tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF Receptor-Associated Factor Family. *J Immunol* 175: 3873-81.
- Orme IM, 2003. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis* 83: 112-115.
- Pando Rogelio H, Salinos RC, Lopez JS, Estrada E, 2007. Immunology, pathogenesis, virulence. In *Tuberculosis 2007*. Editors Juan Palomo:157-193.
- Pando RH, Panduro CA, Madrid-Marina V, Larriva-Sahd J, Orozco EH, Arriaga AK 1998. The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Mol Pathol* 65 (1): 25-36.
- Rand L, Green JA, Saraiva L, Friedland JS, Elkington P.T. 2009. Matrix metalloproteinase-1 is regulated in tuberculosis by a p38 MAPK-dependent, p-aminosalicylic acid-sensitive signaling cascade. *J Immunol* 182: 5865-72.

- Rodrigues MF, Barsante MM, Alves CCS, Souza MA, Ferreira AP, Amarante-Mendes GP, Teixeira HC. 2009. Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. *Immunol* 128: e691-e69
- Ross EM, Gilman AG, 1985. Pharmacodynamic. In *The pharmacological Basis of Therapeutics*. Ed 7Th. Editor Goodman and Gilman. London. MacMilland Publishing Co. Pp: 35-48.
- Salgame Padmini, 2011. MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers. *J Clin Invest* 121(5): 1686-1688.
- Saunders BM, Cheers C, 1996. Intranasal infection of beige mice with *Mycobacterium avium* complex: Role of neutrophils and natural killer cells. *Infect Immun* 64: 4236-4241.
- Saunders BM, Britton WJ, 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immun Cell Biol* 85: 103-111.
- Sheen P, O'kane CM, Chaudhary K, Tovar M, Santillan C, Sosa J, Caviedes L, Gilman RH, Stamp G, Friedland JS. 2009. High Mmp-9 activity characterises pleural tuberculosis correlating with granuloma formation. *Eur Respir J* 33: 134-41.
- Singhal A, Aliouat EM, Herve M, Mathys V, Kiass M, Creusy C, Delaire B, Tsenova L, Fleurisse L, Bertout J, Camacho L, Foo D, Tay HC, Siew JY, Boukhouchi W, Romano M, Mathema B, Dartois V, Kaplan G, Bifani P, 2011. Experimental tuberculosis in the Wistar Rat : A model for protective immunity and control of infection. *Plos One* 6(4):e18632.
- Somashekar Shetty, S. L. Udupa, A. L. Udupa, S. N. Somayaji, 2006. Effect of *C. asiatica* L (umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar Albino Rats. *Int J low Extrem Wounds* 5:137.
- Sugawara I, Udagawa T, Yamada H, 2004. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect Immun* 72 (3): 1804-6.
- Taylor JL, Hattle JM, Dreitz SA, Troudt JM, Izzo LS, Basaraba RJ, Orme IM, Matrisian LM, Izzo AA. 2006. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary *M. tuberculosis* infection. *Infect Immun* 74: 6135-44.
- World Health Organization, 2010. *Who report 2010: Global Tuberculosis Control*.
- Zastrow MV. 2010. Drug receptor and pharmacodynamics. In *Basic and Clinical Pharmacology*. Edisi 12th . Ed: Katzung BG. New York. McGraw Hill Company. Pp: 15-35